

- PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 33/18, 33/15, 33/02		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/25955
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 28. September 1995 (28.09.95)
(21) Internationales Aktenzeichen:	PCT/CH95/00055		
(22) Internationales Anmeldedatum:	13. März 1995 (13.03.95)		
(30) Prioritätsdaten: 811/94-6	19. März 1994 (19.03.94)	CH	(81) Bestimmungsstaaten: AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TT, UA, UG, US, UZ, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO Patent (KE, MW, SD, SZ, UG).
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT VERTRETEREN DURCH DAS AC-LABORATORIUM SPIEZ DER GRUPPE FÜR RÜSTUNGSDIENSTE [CH/CH]; CH-3700 Spiez (CH).			Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): PORTMANN, Rudolf [CH/CH]; Eigerstrasse 55, CH-3000 Bern 23 (CH). LEUMANN, Mathias [CH/CH]; Leisibüel 54, CH-8484 Weisslingen (CH). THOMMEN, Stefan [DE/DE]; Dietlik- erstrasse 44, CH-8302 Kloten (DE).			
(74) Anwalt: PPS POLYVALENT PATENT SERVICE AG; Mellingerstrasse 1, CH-5400 Baden (CH).			

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR DETERMINING TOXICITY AND APPLICATION THEREOF

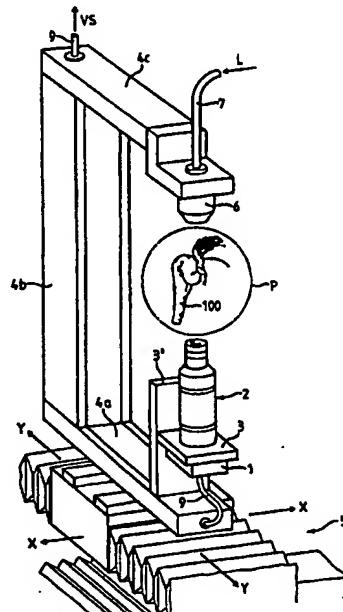
(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR BESTIMMUNG DER TOXIZITÄT SOWIE DEREN ANWENDUNG

(57) Abstract

The invention concerns a method for determining the toxicity of water-soluble substances or of substances which can be mixed with water and thus obtaining quantitative information concerning the toxic effect of said substances. The invention helps to reduce the number of tests, necessary hitherto, performed on mammals. According to the method, at least two measurements determine the variation in mobility and/or size of test organisms in an aqueous medium, under the influence of at least one toxic substance. A device for carrying out the method comprises an image-detection unit which detects the object and sequentially records images of this object in at least one plane at predetermined time intervals. Arranged downstream of the image-detection unit is an evaluation arrangement with a computer and display devices which statistically evaluate the mobility and/or size of the organisms in relation to the existing toxicity. The method is used in particular for determining toxic influences on the environment, in particular water fauna, and for determining side-effects and contra-indications of pharmaceuticals and foodstuffs.

(57) Zusammenfassung

Ein Verfahren zur Bestimmung der Toxizität von wasserlöslichen bzw. mit Wasser mischbaren Substanzen bezieht, quantitative Aussagen über die toxische Wirkung der Substanzen zu erzielen; es stellt einen Beitrag zur Verminderung der Zahl der bisher notwendigen Versuche mit Säugetieren dar. Verfahrensgemäß wird durch wenigstens zwei Messungen die Veränderung der Beweglichkeit und/oder der Grösse von Testorganismen in einem wässrigen Medium unter dem Einfluss von wenigstens einer toxischen Substanz festgestellt. Eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens besteht aus einer Bilderfassungseinheit, welche die Objekterkennung und eine sequenzielle Aufnahme des Objekts in wenigstens einer Ebene in vorbestimmten Zeitintervallen vornimmt, wobei der Bilderfassungseinheit eine Auswerteanordnung mit einem Rechner und Darstellungsgeräten nachgeschaltet ist, welche eine statistische Auswertung der Beweglichkeit und/oder der Grösse der Organismen vornehmen, in Relation zur vorhandenen Toxizität. Anwendung findet das Verfahren insbesondere zur Bestimmung von toxischen Einflüssen auf die Ökologie, insbesondere die Wasserfauna, sowie zur Feststellung von Nebenwirkungen und Kontraindikationen von Pharmazeutika und Nahrungsmitteln.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

- Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Verfahren und Vorrichtung zur Bestimmung der Toxizität sowie
deren Anwendung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der
5 Toxizität von wasserlöslichen bzw. mit Wasser mischbaren
Substanzen.

Ebenso bezieht sich die Erfindung auf eine geeignete Vor-
richtung zur Durchführung des Verfahrens sowie eine An-
wendung des Verfahrens.

10 Es ist notorisch bekannt, dass Lebewesen unter dem Einfluss
von toxischen Substanzen in ihrer Vitalität beeinträchtigt
werden. Dies genügt zum Nachweis des Vorhandenseins derarti-
ger Substanzen, erlaubt aber keine Rückschlüsse auf das Mass
der Toxizität und/oder auf die Substanz.

15 Es ist daher Aufgabe der Erfindung ein Verfahren zu schaf-
fen, das eine quantitative Aussage über die Toxizität von
Substanzen erlaubt und zumindest beiträgt zur Verminderung
von heute noch üblichen, langwierigen Versuchen mit Säuge-
tieren im Rahmen notwendiger Sicherheitsprüfungen.

20 Zudem soll eine Vorrichtung geschaffen werden, welche eine
Automatisierung des Verfahrens erlaubt und dessen Auswertung
rationalisiert und diese aussagekräftig dokumentieren lässt.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe dadurch gelöst, dass
eine Veränderung der Beweglichkeit und/oder der Grösse von
25 wenigstens zwei Individuen von einer Art Testorganismen in
einem wässrigen Medium, unter dem Einfluss von wenigstens
einer toxischen Substanz, in wenigstens zwei Zeitinterval-
len, festgestellt wird, wobei wenigstens eine Referenzmes-
sung und wenigstens eine weitere Messung, nach der Zugabe
30 der toxischen Substanzen, erfolgen.

Der im Patentanspruch verwendete Begriff "Beweglichkeit" wurde von der Festkörperphysik übernommen und beschreibt die "Bewegungsaktivität" und insbesondere die "Mobilität" der Testorganismen, die in wässrigen Medien am einfachsten als 5 deren "Ortsverschiebung" pro Zeiteinheit beobachtet wird.

Diese Beweglichkeit kann aber auch auf die Beobachtung der Funktion einzelner Organe der Testorganismen angewandt werden.

Eine erhöhte Frequenz der Beweglichkeit einzelner Organe 10 lässt auf eine spezifische Toxizität schliessen, wobei die resultierende "Ortsverschiebung" der Organismen nicht zwingend beeinflusst ist.

Bei das Zellwachstum hemmenden Substanzen liefert die Beobachtung bzw. Messung der Grösse der Testorganismen in Funktion 15 der Zeit ein Mass für diese spezifische Art der Toxizität.

Derartige Toxizitätsbestimmungen lassen sich parallel zur Beweglichkeit, aber auch von dieser getrennt, mit den gleichen apparativen Mitteln ausführen.

20 Nach der Erfindung lassen sich Kleinlebewesen zur Bestimmung der Toxizität von Substanzen verwenden, indem der Einfluss von einzelnen und/oder von Kombinationen von Substanzen auf die Veränderung an diesen Tieren gemessen wird. Durch solche Messungen lässt sich die notwendige Anzahl Versuche an leidenden 25 Labortieren massiv verringern.

Bevorzugt wird zur Erhöhung der Aussagekraft der Messungen eine Vielzahl von voneinander getrennten Gruppen gleichartiger Testorganismen beobachtet und pro Gruppe gemeinsam ausgewertet.

30 Ein weiterer Vorteil des Verfahrens liegt in der Einfachheit und raschen Handhabung sowie in seiner Kostengünstigkeit.

Der Begriff der Toxizität ist jedoch nicht auf Giftwirkung im üblichen Sinne beschränkt; er kann auf jede erkennbare Wirkung (Reaktion) auf einen lebenden Organismus ausgedehnt werden.

- 5 Die Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass eine Bilderfassungseinheit vorgesehen ist, welche die Objekterkennung und eine sequenzielle Aufnahme der Lage des Objekts, in wenigstens einer Ebene, in vorbestimmten Zeitintervallen vornimmt, dass der Bild-
10 erfassungseinheit eine Auswerteanordnung mit einem Rechner und Darstellungsgeräten nachgeschaltet ist, welche eine statistische Auswertung der Beweglichkeit der Organismen vornehmen, in Relation zur vorhandenen Toxizität.

Im einfachsten Fall wird dabei die Bilderfassungseinheit mechanisch verschiebar ausgestaltet und über die zu untersuchenden Proben geführt.

Als Veränderung der Beweglichkeit wird - wie in Anspruch 2 dargestellt - eine durch den Testorganismus pro Zeitintervall zurückgelegte Wegstrecke gewertet.

- 20 Signifikante Werte der Beweglichkeit können durch die in Anspruch 3 spezifizierte Beschleunigung, berechnet aus den Geschwindigkeitswerten, gewonnen werden.

Die gemäss der Erfindung ermittelte Toxizität ist - wie in Anspruch 4 dargestellt - eine relative Toxizität, bezogen
25 auf eine Standard-Toxizität.

Sowohl die Bestimmung der Bewegungsgeschwindigkeit als auch die Berechnung der resultierenden Beschleunigungswerte und/oder von Änderungen in der Grösse der Organismen können in einer Ebene als auch dreidimensional durchgeführt werden,
30 je nach apparativem Aufwand. Daraus lassen sich in einfachster Weise charakteristische Messkurven aufzeichnen, die für

die Einflussnahme von Stoffen auch auf höhere Lebewesen interpretierbar sind.

Die Erfindung wird zweckmässigerweise unter Verwendung von niederen Tieren als Testorganismen angewandt. Besonders geeignet sind hierfür Organismen die im Wasser leben, da ihre Beweglichkeit am einfachsten beobachtbar ist.

Die Testdurchführung unter Verwendung von Artemia salina Nauplien ist weder durch jahreszeitliche Abhängigkeit noch durch Fütterung und Aufzucht beeinflusst, wohl aber durch die Umgebungstemperatur und den Faktor Zeit, sodass nur automatisierte Verfahrensabläufe als professionelle Untersuchungsmittel in Frage kommen.

Durch eine Erhöhung der Umgebungstemperatur gegenüber der Normaltemperatur wird erwartungsgemäss eine Zunahme der Beweglichkeit der Testorganismen festgestellt.

Um wiederholbare Resultate zu erreichen ist es empfehlenswert, die Messungen bei 22 °C +/- 1 °C durchzuführen und zu normieren. Dieser Wert lässt sich mit apparativen Mitteln relativ leicht konstant halten und verhindert zudem eine zu hohe Verdunstung bzw. Wasserdampfbildung bei Langzeitbeobachtungen.

Artemia salina bildet unter schlechten Lebensbedingungen Zysten (Eier, die im frühen Gastrulastadium arretiert sind) und so über viele Jahre aufbewahrt werden können.

25 Dementsprechend ist es sehr zweckmässig - wie in Anspruch 5 dargestellt - die Untersuchungen unter Verwendung von Kiemenfüssern (Euphyllopoda) wie Artemia salina Nauplien (in Embryonal-Stadien 3 und 4 mit einer Grösse von ca. 0,9 - 1,15 mm) in Meerwasser durchzuführen.

30 Ebenfalls sind freischwimmende Rotatorien (Ploima) gemäss Anspruch 6 einsetzbar.

Für spezielle Untersuchungen, beispielsweise bei der Überprüfung karzinogener Stoffe, sind Wasserflöhe (Cladocera), Anspruch 7, bevorzugt, da sie in einfacher Weise Beobachtungen über zwei Generationen ermöglichen.

5 Nachdem Artemia salina ein Meerwassertier ist, stellt künstliches Meerwasser eine adäquate Umgebung für die Messung dar, Anspruch 8.

Um eventuelle unkontrollierte Reaktionen zwischen der toxischen Substanz mit Meer- und/oder Leitungswasser auszuschliessen, kann es vorteilhaft sein Süßwasserarten der 10 Kiemenfüsser in künstliches Süßwasser, bestehend aus destilliertem Wasser mit Natriumbicarbonat, einzusetzen. Ebenso empfiehlt sich der Einsatz von künstlich hergestelltem Meerwasser.

15 Andere Organismen, wie Kaulquappen etc. können erfindungsgemäss ebenfalls verwendet werden.

Die Bestimmung der Beweglichkeit der Testorganismen kann - gemäss Anspruch 9 - rein optisch mit Hilfe eines Mikroskops erfolgen, wobei unter dem Einfluss der toxischen Substanz 20 eine Verlangsamung der Beweglichkeit und/oder eine Inaktivierung des Testorganismus zu beobachten ist.

Obwohl diese Messungen mit einem Mikroskop bei einer geringen Anzahl Proben durchaus möglich sind, empfiehlt es sich bereits hier, aus Gründen einer angestrebten Sicherheit und 25 Standardisierung automatisierte Untersuchungsmittel einzusetzen.

In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens erfolgt die Messung - wie im Anspruch 10 dargestellt - unter Verwendung einer Mikrotiterplatte, wie sie beispielsweise im (bis- 30 her nicht publizierten) schweizerischen Patentgesuch Nr. 03 141/93-6 im einzelnen beschrieben ist.

Zur bevorzugten elektrooptischen Instrumentalanalyse, Anspruch 11, werden in die oben beschriebenen Gefässen die zu ermittelnden wasserlöslichen Substanzen in Wasser bzw. einem künstlichen Meerwasser gelöst und der Testorganismus zugesetzt und deren Reaktionen elektronisch ausgewertet.

Es wird dabei die Veränderung der Beweglichkeit der Testorganismen pro Gefäß gemittelt und mit bereits früher erfassten Werten verglichen. Entsprechende Korrelationen erlauben quantitative Aussagen über die vorhandene Toxizität,
10 Anspruch 12.

Die obigen Untersuchungen sollen zweckmässigerweise immer unter den selben Bedingungen - wie in Anspruch 13 dargestellt - durchgeführt werden, da das Resultat durch die Temperatur beeinflusst wird.

15 Der Verfahrensablauf lässt sich durch das in Anspruch 14 beschriebene systematische Zupipettieren massgeblich optimieren; potentielle Fehlerquellen lassen sich dadurch weitgehend eliminieren.

Die zur Durchführung des Verfahrens vorgesehene Vorrichtung erlaubt eine einfache Auswertung der beobachteten Bilder durch übliche EDV-Mittel; durch die in Anspruch 16 erwähnte Quotientenbildung aller zurückgelegten Wegstrecken pro Zeitintervall und pro Bild lässt sich eine relative mittlere Geschwindigkeit der Testorganismen bestimmen bzw. durch die 25 zweite Ableitung auch deren Beschleunigungswerte.

Von besonderer Bedeutung ist eine Unterscheidung zwischen bewegten und nicht bewegten Objekten, da sich viele Testorganismen einerseits während der Beobachtungsdauer häuten und diese abgestossenen Häute zu Fehlerfassungen führen können; andererseits müssen die bereits gestorbenen Tiere festgestellt und aus der Rechnung eliminiert werden, Anspruch 17.

Besonders geeignet zur Durchführung des Verfahrens ist eine sogenannte CCD-Shutter-Kamera nach Anspruch 18, da zurzeit nur derartige Kameras in der Lage sind, genügend scharfe und auswertbare Bilder zu liefern.

5 Durch die in Anspruch 19 vorgeschlagene Anordnung von zwei Kameras lassen sich die Bewegungen der Testorganismen in drei Dimensionen beobachten und vermessen.

Bei einem genügend grossen apparativen Aufwand, dh. bei Verwendung entsprechender Kameras und genügend grosser Bilddatenspeicher und ausreichend schneller Rechner könnten grundsätzlich alle in einer Versuchsanordnung befindlichen Testorganismen gleichzeitig aufgenommen und einzeln ausgewertet werden, vgl. Anspruch 20.

15 Eine rationelle automatisierte Beobachtung und Auswertung von Testorganismen kann mit den Angaben nach Anspruch 21 oder 22 realisiert werden, vorausgesetzt, dass der verwendete Transportmechanismus erschütterungsfrei arbeitet.

20 Die in den Ansprüchen 23 - 25 aufgezeigten Anwendungen beziehen sich auf aktuelle Bedürfnisse des Umweltschutzes bzw. der Lebensmitteltechnologie und Pharmaindustrie. Selbstverständlich sind weitere Applikationen denkbar, die auch andere Gebiete der Biologie betreffen.

25 Die Toxizitätsermittlung, wie sie eingehend mit Artemia salina Nauplien erprobt wurde, ermöglicht die Abklärung der relativen Toxizität von Substanzen in einem wässrigen Medium, dh. von wasserlöslichen Substanzen aber auch von Substanzen, die mit Hilfe von Lösungsvermittlern wie zB. Aceton wasserlöslich gemacht wurden. Sie ermöglicht aber auch - wie in den Ansprüchen 23 bis 25 dargestellt ist - einen Aufschluss über die toxische Wirkung von Substanzen auf die Wasserfauna, insbesondere von Insektiziden und Pestiziden.

Im weiteren lassen sich durch periodische Messungen in gleichen Zeitintervallen und mit steigender Konzentration der toxischen Dosen durchgeführte Messungen charakteristische Letaldosis-Kurven aufzeichnen, welche Rückschlüsse auf die 5 Art des toxischen Stoffes zulassen und zur Ergründung des Wirkmechanismus des Stoffes oder der Stoffkombination beitragen.

Nachfolgend werden anhand von Zeichnungen Ausführungsbeispiele der Erfindung näher dikutiert.

10 Es zeigen:

Fig. 1 eine schematische Darstellung einer elektrooptischen Bilderfassungseinheit mit einem charakteristischen Testorganismus zur Bestimmung von dessen Beweglichkeit,

15 Fig. 2 eine Gesamtansicht eines Gerätes mit Bilderfassungseinheit und Auswerteanordnung,

Fig. 3 eine Teilschnittdarstellung durch den Geräteschrank Fig. 2, orthogonal zur Frontplatte,

20 Fig. 4 eine Teilschnittdarstellung durch das Gerät Fig. 2 parallel zur Frontplatte,

Fig. 5 eine Titerplattenanordnung zur Aufnahme von sechs Probenplatten,

25 Fig. 6 ein Flussdiagramm, welches den Programmablauf zur automatisierten Bestimmung der Beweglichkeit von Testorganismen aufzeigt,

Fig. 7 eine charakteristische mittlere, zeitliche Geschwindigkeitsabnahme von lebenden Testorganismen in drei ausgewählten toxischen Lösungen, beobachtet über einen Zeitraum von 10 Stunden,

Fig. 8 einen Toxizitätstest mit Artemia salina in einer Paraoxon Lösung, wobei in der Abszisse die Konzentration und in der Ordinate der Anteil toter Organismen aufgetragen sind,

5 Fig. 9 einen weiteren Toxizitätstest, wobei hier die Geschwindigkeit der Testorganismen in Funktion der Konzentration von Paraoxon, zusammen mit einer überlagerten Letalitätsdosiskurve dargestellt ist,

10 Fig. 10 eine Videoaufnahme einer Gruppe von lebenden Testorganismen in einem wässrigen Medium zu Beginn der Beobachtung,

Fig. 11 eine weitere Videoaufnahme der Gruppe von noch lebenden Testorganismen Fig. 10 nach 24 Stunden, wobei ein Teil des Mediums verdunstet ist,

15 Fig. 12 ein Aktions/Zeitdiagramm welches die Vorbereitung, Durchführung und Auswertung der Messung der Beweglichkeit von Testorganismen aufzeigt,

Fig. 13 die Messung von bis zu 6 Titerplatten nach dem Diagramm Fig. 12,

20 Fig. 14 die Messung von bis zu 10 Platten, wobei für eine Platte eine Zeitdauer von bis zu 10 Minuten zulassen ist,

Fig. 15 sequentiell ablaufende Einzelmessungen, dargestellt im Zeitintervall der Messung einer Platte,

25 Fig. 16 die zum Messen eines einzelnen Behälters vorgesehenen Intervalle, wobei die Zeiträume zwischen den Einzelmessungen durch den Transportmechanismus der Kamera bestimmt sind und

Fig. 17 eine Sequenzauswertung aller Abläufe die notwendig sind, um ein einzelnes Gefäss in einer Titerplatte auswertbar zu registrieren.

In Figur 1 ist mit 1 eine Videokamera (CCD-Shutter-Kamera; 5 Firma Sony Typ XC-77RR-CE) bezeichnet. Die auf die elektronische Kamera 1 aufgesetzte Optik 2 ist ein Makro-Objektiv (Sony Typ CM50). Die Videokamera 1 ist auf zwei Supports 3,3' in an sich bekannter Weise vertikal an einem C-Arm 4a - 4c angeordnet. Der C-Arm ruht auf einer handelsüblichen 10 Positionierungs-Einheit 5, ein XY-Kreuztisch mit zwei Vorschubeinheiten (Firma ISEL Automation D-6419 Eiterfeld) mit entsprechenden Schrittmotoren, welche eine Verschiebungs- länge von 400 mm in X-Richtung bzw. 300 mm in Y-Richtung bewirken.

15 Zwischen der Optik 2 und dem Lichtverteiler 6 befinden sich Proben P, charakterisiert durch eine Artemia salina 100, welche im Durchlichtverfahren beobachtet wird.

Vertikal oberhalb der Optik 2 der Kamera 1 ist im C-Arm ein Lichtverteiler 6, angeordnet, welche über einen Lichtleiter 20 7 von einer hier nicht dargestellten Lichtquelle gespeist ist. Die Videosignale VS werden über eine Signalleitung 9 nach oben geführt, vgl. Fig. 3, Fig. 4.

Die gesamte Vorrichtung zur Beobachtung und Auswertung von Testorganismen ist in einer Bilderfassungs- und Auswerteeinheit 10, 10', in Fig. 2, mit 10 bezeichnet, zusammengefasst. 25 In einem Geräteschrank 11 kann über zwei Türen 12a, 12b ein Probenraum mit Experimenten beschickt werden. Auf dem Geräteschrank 11 befindet sich eine handelsübliche Zentraleinheit 15 eines Personal Computers (PC) mit einem ebenfalls 30 üblichen Monitor 14. Neben dem PC ist, auf einem drehbaren Ständer angeordnet, ein weiterer Monitor 13, welcher die Aufnahmen der im Geräteschrank 11 befindlichen Video-Kamera darstellt. Auf dem Geräteschrank 11 ist eine Ablagefläche 16 für hier nicht gezeichnete, aber für die Bedienung des Gerä-

tes erforderliche Bedienungs- und Eingabegeräte (Tastatur, Maus etc.) vorgesehen.

Die Schnittdarstellung Fig. 3 zeigt das Innere des Geräteschrances, wobei die Orientierung des Schnittes durch die 5 Lage der Türen 12a, 12b, vgl. Fig. 2, gegeben ist. Hier sind wiederum der C-Arm 4a, 4b, 4c mit seinen Bestandteilen, Fig. 1 ersichtlich; ebenso die Positionierungseinheit 5 sowie der Lichtleiter 7, welcher mit einer üblichen Lichtquelle 8 verbunden ist.

10 In einem durch die Türen 12a, 12b zugänglichen Probenraum 20 befindet sich eine Titerplattenanordnung 21, welche Proben mit Testorganismen aufnimmt. Versorgt ist das Ganze durch eine handelsübliche, unterbrechungsfreie Stromversorgung 22, Fig. 3 und 4. Sämtliche für die Steuerung der Positionierungseinheit 5 notwendigen Signale werden in einer Steuerung 15 generiert. Die Videosignale VS werden zu einer üblichen Kamera-Kontrolleinrichtung im Steuer-Computer 15 geführt.

Nicht dargestellt sind die notorisch bekannten Peripheriegeräte wie Drucker, Plotter etc., welche an den PC anschliessbar sind.

In Figur 5 ist die im Probenraum 20 angeordnete Titerplattenanordnung 21 mit ihren wesentlichsten Bestandteilen gezeichnet.

Die Anordnung 21 besteht aus einem im Geräteschrank 11 festgeschraubten Rahmen mit Öffnungen 24, in welchen sechs Mikrotiterplatten 24.1 - 24.6 mit je 96 Gefässen einsetzbar sind und welche pro Gefäss je eine Probe mit Testorganismen (zirka 12 Artemia salina) enthalten. Ein nicht dargestellter Schutzdeckel verhindert die Störung der Proben durch Staubeinwirkung und/oder Wärmestrahlungen etc.; ebenso sind die einzelnen Titerplatten zur Reduktion der Verdunstungswirkung mit einem transparenten Kunststoff abgedeckt.

WO 95/25955

PCT/CH95/00055

- 12 -

Mit der vorgängig beschriebenen Vorrichtung lässt sich die Beweglichkeit von Testorganismen messen. Am einfachsten geschieht dies durch die Feststellung der Fortbewegungsgeschwindigkeit der Organismen in einer Testlösung, wobei die 5 relative Geschwindigkeit auf eine Kontroll-Lösung (ohne toxische Substanz) bezogen ist.

Der Benutzer wird beim Entwerfen des Experiments zweckmässigerweise über ein PC-Programm angeleitet. Dieses erfragt über die Anzahl Konzentrationen (in Mol oder Prozent) und 10 Parallelbestimmungen, Leerwerte, Kontrollen und deren Anordnung, sowie über die Plazierung des Experiments in den jeweiligen Gefässen der Mehrgefäßsanordnung. Im weiteren verlangt das Programm Angaben über den Namen der Testsubstanz, deren Molekulargewicht, höchste zu testende Konzentration 15 und Wahl der linearen oder logarithmischen Verdünnungsreihe. Nach Eingabe des Totalvolumens für den Test, des Volumens in dem die Testorganismen (beispielsweise Artemia salina) sowie die Testsubstanz zugesetzt werden, berechnet das Programm die für das Experiment benötigte Menge der Testsubstanz. 20 Nach der Erfassung der abgewogenen Menge können nun direkt unter Führung des Programms, die benötigten Verdünnungen hergestellt werden. Durch eine optische Hilfe auf dem Bildschirm, wird das Zupipettieren erleichtert.

Eine bevorzugte Meerwasserlösung enthält 2800 mg NaCl, 342 25 mg MgSO₄·7H₂O, 234 mg MgCl₂·6H₂O, 122 mg CaCl₂·2H₂O, 20 mg NaHCO₃, 74 mg KCl auf 100 ml destilliertes Wasser.

Durch eine elektrooptische Bestimmung wird in einem ersten Schritt die Anzahl der Testorganismen bestimmt, welche sich in der mit der zu untersuchenden Substanz versetzten, künstlichen Meerwasserlösung befinden. 30

Die Beobachtung des Einflusses der Substanz auf den Organismus erfolgt über das dargestellte Bildanalysensystem zu vorgewählten Zeitpunkten. Sie gestattet folgende Kriterien zu erfassen:

- Anzahl der Organismen
- Bestimmung, wie viele davon nicht mehr aktiv sind
- Ermittlung der durchschnittlichen Beweglichkeit bzw. relativen Bewegungsgeschwindigkeit
- 5 - Durchschnittliche Grösse (relative Fläche) der Organismen; Berechnung ihres individuellen, lageabhängigen Flächenschwerpunktes.

Die elektrooptische Bestimmung wird grundsätzlich wie folgt durchgeführt:

- 10 Die Proben werden in der Mikrotiterplatte, die den Test enthält, im beschriebenen Analysenautomaten plaziert. Zu den vorgewählten Messzeiten fährt eine elektronische Kamera unter die einzelnen Messplätze der Mikrotiterplatte und nimmt 12 bis 36 Bilder auf. Gleichzeitig wird die jeweilige Probe 15 von oben beleuchtet. Damit diese Bilder scharf ausfallen, muss mit einer Kamera mit Verschlusszeitsteuerung gearbeitet werden. Das Objektiv dieser Kamera ist so ausgelegt, dass einerseits das Bild formatfüllend aufgenommen wird, anderseits die ganze Tiefe der Flüssigkeit (ca. 1 cm) scharf abgebildet werden kann. Die Beleuchtung erfolgt über einen 20 Lichtleiter, der an den C-Arm zusammen mit der Kamera befestigt parallel fährt. Die Auflösung der Bilder wurde so optimiert, dass mit einem Minimum an Bildpunkten die ganze Analyse durchgeführt werden kann. Dies erlaubt, die Rechenzeit 25 für die Bildanalyse möglichst tief zu halten. Es wurde eine Auflösung von 256 mal 256 Bildpunkte gewählt. Diese Auflösung gestattet, die Umrisse der Organismen noch eindeutig zu erkennen. Dabei wird auch eine Mess- und Auswertezeit von ungefähr drei Minuten pro Mikrotiterplatte (mit 96 Gefäßen), d.h. ungefähr 2 Sekunden pro Messplatz erreicht.
- 30

Die Daten werden nach Abschluss der Messung auf einer Diskette gespeichert und können nun direkt mit einem PC-Pro-

WO 95/25955

PCT/CH95/00055

- 14 -

gramm ausgewertet werden. Dabei werden die Daten zusätzlich grafisch dargestellt, und die charakteristischen Toxizitätswerte direkt ermittelt. Diese Daten werden nun in einer Datenbank so abgespeichert, dass sie jederzeit zu Vergleichs-
5 zwecken zur Verfügung stehen.

Zur Durchführung der obigen Instrumental-Analyse von flüssigen Proben, werden Mikrotiterplatten verwendet, die aus transparentem Material bestehen. Durch eine, aus zwei Materialien unterschiedlicher physikalischer Eigenschaften zu-
10 sammengefasste Mehrgefäßanordnung, lässt sich die Grenzflächenspannung an der Flüssigkeitsoberfläche einstellen, so dass diese wenigstens annähernd planar ist. Bevorzugterweise werden dabei die Böden der Mehrgefäßanordnung aus transparentem Material (CH-Gesuch Nr. 03 141/93-6), beispielsweise
15 Polystyrol oder einem Copolymeren eines Polystyrols gefertigt und die Wände aus wenig lichtdurchlässigem Material, beispielsweise Polyolefinen oder Polytetrafluorethylen, die keine Meniskusbildung oder Proteinadsorption hervorrufen.

Der oben skizzierte, realisierte Programmablauf in der Vor-
richtung gemäss Fig. 1 bis 5 ist aus der Darstellung Fig. 6 zu entnehmen, wobei der Start mit St und das Programmende mit RES = Resultat bezeichnet sind.

Nach dem Start erfolgt eine Aufnahme der Bildsequenzen mit konstantem Zeitintervall Δt , und zwar online, wobei die
25 Werte in bekannter Weise binärisiert und zwischengespeichert werden: Mit B-S bezeichnet.

Anschliessend erfolgt eine Bestimmung des Messfensterradius, abhängig vom Flüssigkeitsstand: Ro bezeichnet.

In einem nächsten Schritt erfolgt eine Objektbezeichnung und
30 eine Bestimmung der Objektparameter bei allen Bildern innerhalb des Messfensters, dh. die Schwerpunktkoordinaten, die relative Fläche, der Umfang und die Anzahl visuell (elektro-

WO 95/25955

PCT/CH95/00055

- 15 -

nisch) feststellbaren Löcher im Objekt werden zur Identifikation, in jedem Gefäß vermessen: O-P1.

Danach werden unzulässige Objekte bei allen Bildern eliminiert, wobei das Kriterium durch zulässige Vorgaben von Fläche und Umfang programmiert ist: O-E1.

Jetzt wird die Anzahl Testorganismen pro Sequenz zu allen Bilddaten ermittelt, mit O-CL = Objekt-Auszählung bezeichnet; dies entspricht der Gesamtzahl lebender Organismen pro Bild.

10 Durch eine Messung der Geschwindigkeit der Organismen aus allen vorgängig ermittelten Bilddaten wird ein Mittelwert gebildet. Dieser Wert ist in Fig. 6 mit O-v = mittlere Geschwindigkeit der Organismen bezeichnet, wobei als Messreferenz jeweils die momentane Koordinate des Flächenschwerpunktes in der Silhouette des Organismus dient.

Anschliessend wird ein Resultatbild auf der Basis von Bildpunkten mit deren Koordinaten x_i, y_i erzeugt und derart normiert, dass die Zahl 1 ein nicht bewegtes, totes Objekt bedeutet. Alle übrigen Bildpunkte x_i, y_i werden dabei Null 20 (= 0) gesetzt. Bezeichnet ist diese Verfahrensstufe mit $R(x_i, y_i)$.

Unter O-P2 erfolgt wiederum eine Objektbezeichnung und eine Bestimmung der Objektparameter bei allen Bildern innerhalb des Messfensters, dh. die Schwerpunktkoordinaten, die relative Fläche, der Umfang und die Anzahl Objekte im Gefäß werden vermessen.

Danach werden wiederum die unzulässigen Objekte bei allen Bildern eliminiert, wobei das Kriterium durch zulässige Vorgabe von Fläche und Umfang programmiert ist: O-E2.

30 Danach werden die verbleibenden, toten Objekte im Resultatbild gezählt: O-CD.

Unter RES erfolgt die Auswertung der Ergebnisse mit statistischen Methoden in an sich bekannter Weise (Probit etc.)

Wie Fig. 7 zeigt, wurden in drei bekannten, ausgewählten toxischen Lösungen, enthaltend Phenobarbital mit Ph bezeichnet, Amphetaminsulfat mit Am und D-Propoxyphen mit Pr bezeichnet. Die Ortsverschiebungen pro Zeiteinheit von Artemia salina wurde als mittlere Geschwindigkeit \bar{v} ermittelt und aufgezeichnet.

In einer Kontroll-Lösung, dh. in einer nachfolgend beschriebenen Lösung aus künstlichem Meerwasser, wurden typische mittlere Geschwindigkeiten der Artemia salina von $5 \cdot 10^{-3}$ m/s bis $6 \cdot 10^{-3}$ m/s festgestellt.

Wie aus der Darstellung Fig. 7 zu entnehmen ist, erfolgt im Falle von D-Propoxyphen eine relativ lineare Geschwindigkeitsabnahme über einen Zeitraum von 10 Stunden auf zirka 84 % der ursprünglichen Geschwindigkeit. Bei Amphetaminsulfat resultiert eine Abnahme der Geschwindigkeit auf zirka 65 % der ursprünglichen Geschwindigkeit und bei Phenobarbital auf zirka 80 %.

Es hat sich gezeigt, dass je nach Toxizitätsäquivalentfaktor (Art oder Gruppe oder Klasse des toxischen Stoffes) charakteristische Geschwindigkeitsabnahmen feststellbar sind. Dies kann auf signifikante und damit der Erkennung dienende Wirkungen einzelner Stoffe und Kombinationen von Stoffen ausgedehnt werden.

Je nach Art der Wirkung des Stoffes auf den Organismus kann durch eine entsprechende Bildauswertung die Aussagekraft der Messung durch eine Anpassung des Messverfahrens optimiert werden. Beispielsweise kann anstelle der Beobachtung der Fortbewegungsgeschwindigkeit die spezifische Beweglichkeit einzelner Organe des Organismus beobachtet werden; ausserdem können zyklische Bewegungen durch die Bildung der ersten Ab-

leitung aus der Geschwindigkeitsmessung hervorgehoben bzw. einfacher erfasst und analysiert werden.

Praktisches Beispiel zur Bestimmung der Toxizität von Paraoxon:

5 In Fig. 8 ist der Anteil Z an toten Organismen, bezogen auf 100 % zu Beginn der Messung; bei zunehmender Konzentration C von Paraoxon wird ein Ansteigen von Z festgestellt. Diese Art der Auswertung ermöglicht die notorisch bekannte Bestimmung des LC₅₀-Wertes der toxischen Substanz.

10 Die Anzahl der toten *Artemia salina* wird aufgrund der Messung der Geschwindigkeit der Testorganismen nach dem oben beschriebenen Verfahren berechnet, wobei eine festgestellte Geschwindigkeit Null ein totes Tier bedeutet.

Die in Fig. 8 dargestellte Kurve ist ein Mittelwert von vier unabhängigen Versuchsreihen über einen Konzentrationsbereich von Paraoxon in künstlichem Meerwasser über drei Dekaden. Der Mittelwert der so gemessenen LC₅₀-Werte bei einer Temperatur von 22°C beträgt $5,9 \cdot 10^{-5}$ Mol/l bei einer maximalen Streuung von 33 %.

20 Fig. 9 zeigt die Geschwindigkeit \bar{v} der *Artemia salina* Test-organismen in einer Versuchsreihe gemessen 30 min. nach Zugebung der Paraoxon-Lösungen mit steigenden Konzentrationen. Es sind hier zwei drastische Abnahmen der Geschwindigkeit ersichtlich. Die zweite Abnahme, bei zirka $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l Paraoxon entspricht dem LC₅₀-Wert, welcher aus der überlagerten Letalitätsdosiskurve entnehmbar ist.

Die signifikante erste Geschwindigkeitsabnahme liegt bei etwa $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l Paraoxon und entspricht der "Effect Concentration" EC₅₀. Diese ermittelt eine Indikation der Funktion der toxischen Substanz.

Charakteristische Videoaufnahmen sind aus Fig. 10 (zu Beginn des Experimentes) und Fig. 11 (Ende des Experimentes nach 24 Stunden) ersichtlich. In der zweiten Aufnahme sind die toten, d.h. unbewegten Tiere, in an sich bekannter Weise elektronisch unterdrückt und daher auf dem Monitor 13, Fig. 2, unsichtbar.

In Fig. 11 ist zusätzlich ein Radius Rx eingetragen welcher ein eventuelles Verdunsten von Flüssigkeit mit daraus resultierender Reduktion des Messfenster-Radius andeutet; gestrichelt eingezeichnet.

Weitere Einzelheiten im technischen Verfahrensablauf sind den Fig. 12 - 17 zu entnehmen, wobei das Aktions/Zeitdiagramm Fig. 12 den gesamten Verfahrensablauf zeigt. Bezeichnet ist dieses Diagramm in den einzelnen Stufen mit I - V, wobei die Verfahrensschritte auf der Abszisse in der Größenordnung ihrer Zeitdauer herauslesbar sind.

Dabei bedeuten:

- I die Vorbereitung der Messreihe mit einer "Setup-Hilfe" am PC zum Beschicken der Titerplatten,
- 20 II eine Kalibrierung der Startwerte des Überwachungsprogramms,
- III das Zuführen der toxischen Substanz,
- IV die Aufnahme der Messreihe mit dem Überwachungsprogramm,
- 25 V die Auswertung der Messreihe mit statistischen Analysemethoden und Korrelationen zu bisherigen Messungen (Datenbank).

WO 95/25955

PCT/CH95/00055

- 19 -

Die nachfolgenden Fig. 13 bis Fig. 17 betreffen all die Verfahrensstufe IV, was in aus Übersichtlichkeitsgründen in jedem Aktions/Zeitdiagramm vermerkt ist.

Figur 13 zeigt den typischen Ablauf bei der Aufnahme einer 5 Messreihe mit bis zu sechs Titerplatten, wobei im "Studentakt" während 24 Stunden gemessen wird. Diese Messreihe entspricht in Fig. 12 der Position IV.

In Fig. 14 ist die Position IV (Aufnahme der Messreihe) im einzelnen dargestellt. Die einzelnen Titerplatten sind hier 10 mit P1 01 - P1 06 bezeichnet; die maximale Messdauer ist in praxi auf 10 Minuten begrenzt.

Aus Fig. 15 lassen sich die einzelnen Verfahrensschritte während der Messdauer herleiten. Dabei bedeuten:

- 15 a1 die Erstellung einer Binärisierungsschwelle zur Bildverarbeitung,
- a2 die Einstellung bzw. Überprüfung der Fokussierung der Kamera mittels der Bildverarbeitung,
- 20 a3 die Prüfung der Orientierung der Titerplatten (zur Festlegung und Berücksichtigung der abnehmenden Konzentrationswerte der Proben),
- a4 das Vermessen eines ersten Gefäßes,
- a5 - a7 das Vermessen eines beliebigen bzw. des n-ten Gefäßes.

Die Darstellung Fig. 16 zeigt die sequentielle Bildaufnahme 25 pro Gefäß, wobei hierfür in praxi eine maximale Zeitdauer von 20 ms vorgesehen ist.

Fig. 17 zeigt die Sequenzauswertung und zwar sind mit S1 der auswertbare Radius des Gefäßes, mit S2 die Schwerpunkts-Ko-

ordinaten sämtlicher Testorganismen (im Bild 1) und die Schwerpunkts-Koordinaten sämtlicher Organismen in Bild n bezeichnet, welche durch die Bildverarbeitung bestimmt werden.

In der Folge werden, mit S4 bezeichnet, die Anzahl der Organismen und deren Mittlere Geschwindigkeit aus allen Bilddaten rechnerisch ermittelt.

Die weiteren Sequenzen sind S5, das Kombinieren sämtlicher Bilder zu einem Resultatbild, welches nur tote Organismen enthält und die Sequenz S6, das Auszählen der toten Organismen mittels der Bildverarbeitung.

Die weitgehend anhand von toxischen Stoffen geführten Untersuchungen lassen sich generell auf die Bestimmung von Schwellenwerten, Schwellenreizen, Schwellendosen und Konzentrationen ausdehnen.

Die Verwendung von Kleinlebewesen ermöglicht überdies eine gewaltige Einsparung an Versuchstieren, da deren Zahl durch vorherige Bestimmung der zu testenden Konzentrationen eingeschränkt werden kann.

Denkbar ist eine Anwendung des Erfindungsgegenstandes auf weitere, bisher noch nicht erprobte Organismen wie Nematoda (Fadenwürmer) und andere, wie auch im Mikrobereich liegende Organismen.

Ebenfalls kann das Verfahren mit konventionellen Analysemethoden kombiniert werden, so dass die Messdauer verkürzt und die Aussagekraft der Messung zusätzlich erhärtbar ist, ohne dass aufwendige Versuchreihen erforderlich sind.

WO 95/25955

PCT/CH95/00055

- 21 -

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Bestimmung der Toxizität von wasserlöslichen bzw. mit Wasser mischbaren Substanzen, dadurch gekennzeichnet, dass eine Veränderung der Beweglichkeit und/oder der Grösse von wenigstens zwei Individuen von einer Art Testorganismen in einem wässrigen Medium, unter dem Einfluss von wenigstens einer toxischen Substanz, in wenigstens zwei Zeitintervallen, festgestellt wird, wobei wenigstens eine Referenzmessung und wenigstens eine weitere Messung nach der Zugabe der toxischen Substanzen erfolgen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Veränderung der Beweglichkeit die durch den Testorganismus pro Zeitintervall zurückgelegte Wegstrecke gewertet wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Veränderung der Beweglichkeit die pro Zeitintervall festgestellte Änderung der Geschwindigkeit des Testorganismus gewertet wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die ermittelte Toxizität als relative Toxizität gewertet wird.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Testorganismus Kiemenfüsser wie *Artemia salina*, *Streptocephalus proboscideus* eingesetzt werden.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Testorganismus frei schwimmende Rotatorien wie *Brachionus calyciflorus* oder *Brachionus plicatilis* eingesetzt werden.

7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Testorganismus Wasserflöhe wie *Daphnia magna* oder *Daphnia pulex* eingesetzt werden.
8. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass 5 als wässriges Medium künstliches Meer- oder Süßwasser eingesetzt wird.
9. Verfahren nach den vorhergehenden Ansprüchen, dadurch gekennzeichnet, dass die Veränderung der Beweglichkeit und/oder Grösse des Testorganismus mit Hilfe eines Mi-10 kroskopes beobachtet wird.
10. Verfahren nach den vorhergehenden Ansprüchen, dadurch gekennzeichnet, dass die Veränderung der Beweglichkeit und/oder Grösse des Testorganismus in einer Mikrotiterplatte beobachtet wird.
- 15 11. Verfahren nach Anspruch 1 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Veränderung der Beweglichkeit und/oder Grösse des Testorganismus auf elektrooptischem Weg be-10 obachtet und ausgewertet wird.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dass als Mass für die rela-20 tive Beweglichkeit und/oder Grösse des Testorganismus ein Mittelwert aus allen im gleichen Zeitintervall und unter gleichen Bedingungen beobachteten Organismen be-rechnet wird.
13. Verfahren nach den vorhergehenden Ansprüchen, dadurch 25 gekennzeichnet, dass die Messung im wässrigen Medium nach einer Einstellung der Temperatur auf einen vorgegebenen, konstanten Wert durchgeführt wird.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch 30 gekennzeichnet, dass die Zugabe der toxischen Substanzen durch eine, über einen Bildschirm kontrollierte Zupipettierung vorgenommen wird.

15. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach den Ansprüchen 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass eine Bild erfassungseinheit (10) vorgesehen ist, welche die Objekterkennung und eine sequenzielle Aufnahme der Lage des Objekts (100), in wenigstens einer Ebene, in vorbestimmten Zeitintervallen vornimmt, dass der Bild erfassungseinheit (10) eine Auswerteanordnung (10') mit einem Rechner und Darstellungsgeräten nachgeschaltet ist, welche eine statistische Auswertung der Beweglichkeit und/oder Grösse der Organismen vornehmen, in Relation zur vorhandenen Toxizität.
16. Vorrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Bild erfassungseinheit (10) von wenigstens einer, unter den gleichen Bedingungen befindlichen, Gruppe von Testorganismen (100) ein Grauwertbild aufnimmt und dass die nachgeschaltete Auswerteanordnung (10') daraus binäre Schwarz/Weiss-Werte bestimmt und eine sequenzielle Einzelbildauswertung mit einer Angabe der momentanen Koordinaten-Lage der Testorganismen vornimmt, welche im Rechner durch einen Vergleich mit einem zuvor aufgenommenen Bild und wenigstens einer Quotientenbildung mit dem Zeitintervall zwischen den beiden Bildern, ein Relativmass der Beweglichkeit und/oder Grösse der Organismen berechnet.
- 25 17. Vorrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Auswerteanordnung (10') erfasste Objekte mit der relativen Beweglichkeit Null einerseits im Bild markiert und andererseits diese im Rechner eliminiert.
- 30 18. Vorrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Bild erfassungseinheit (10) eine einzige CCD-Shutter-Kamera aufweist, welche taktweise über die jeweilige Gruppe von Testobjekten (100) unter den gleichen Bedingungen geführt ist.

19. Vorrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet,
dass die Bilderfassungseinheit (10) zwei CCD-Shutter-
Kameras aufweist, deren optische Achsen zueinander
wenigstens in einem spitzen Winkel angeordnet sind und
5 die Bewegung und/oder Grösse der Testorganismen in drei
Dimensionen erfassen.
20. Vorrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet,
dass die Bilderfassungseinheit (10) stationär ist und
dass diese mehrere, unter unterschiedlichen Bedingungen
10 befindliche Gruppen von Testorganismen (100) gleichzei-
tig erfasst und der Auswertung zuführt.
21. Vorrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet,
dass die Bilderfassungseinheit (10) stationär ist und
dass mehrere, unter unterschiedlichen Bedingungen be-
15 findliche Gruppen von Testorganismen (100) mit konti-
nuierlicher Geschwindigkeit an dieser vorbeigeführt
sind und dass die Bilderfassungseinheit (10) diese Gru-
ppen sequenziell erfasst und der Auswertung zuführt.
22. Vorrichtung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet,
20 dass unter unterschiedlichen Bedingungen befindliche
Gruppen von Testorganismen (100) kreisförmig unter der
Bilderfassungseinheit geführt sind.
23. Anwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis
13 zur Bestimmung von toxischen Wirkungen auf die Was-
serfauna.
25
24. Anwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis
13 zur Bestimmung des Einflusses von toxischen Substan-
zen wie Insektizide und Pestizide auf die Ökologie.
25. Anwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis
30 13 zur Bestimmung von Nebenwirkungen und Kontraindika-
tionen von Pharmazeutika und Nahrungsmitteln.

WO 95/25955

PCT/CH95/00055

1 / 12

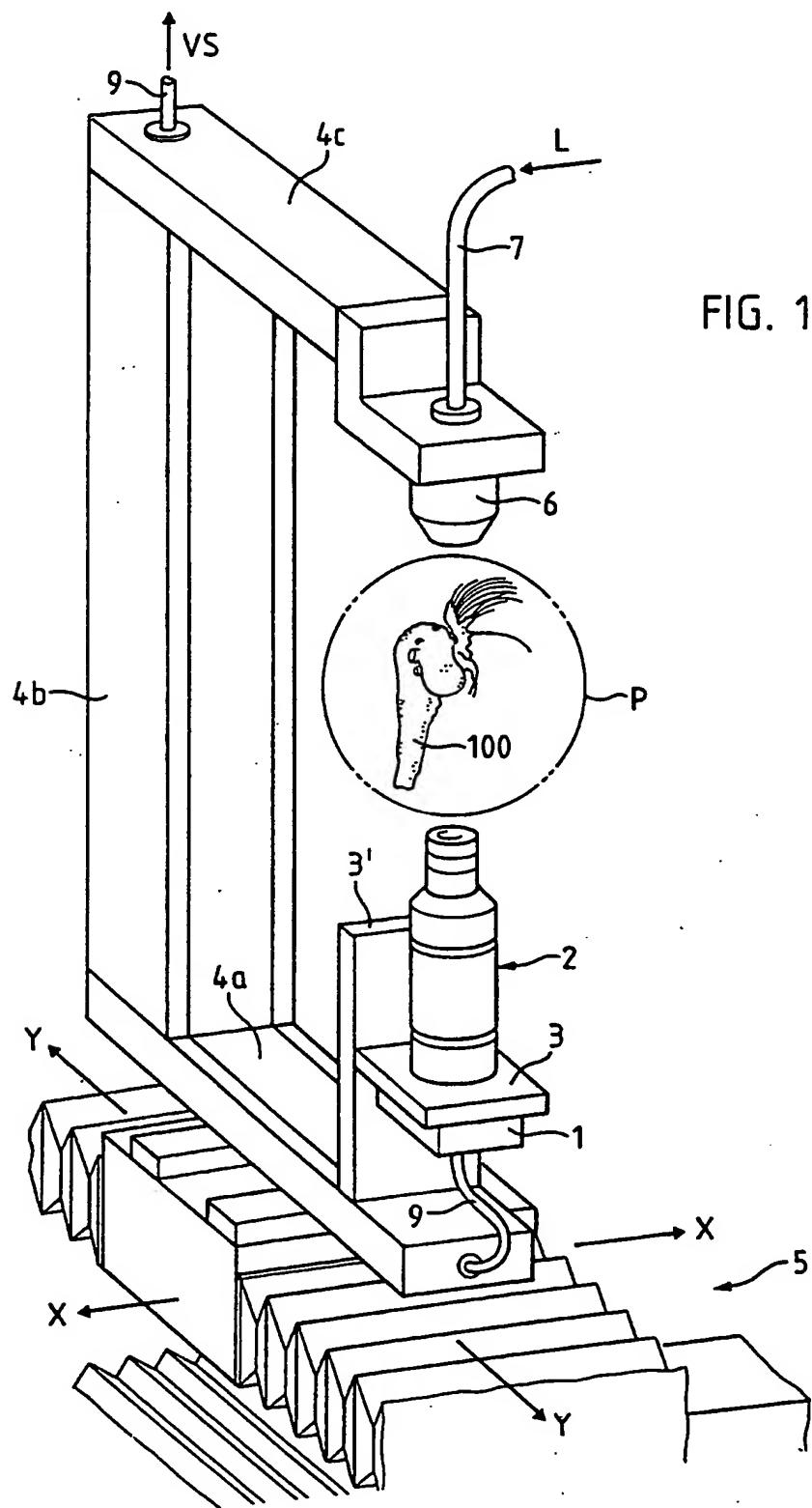


FIG. 1

WO 95/25955

PCT/CH95/00055

2 / 12

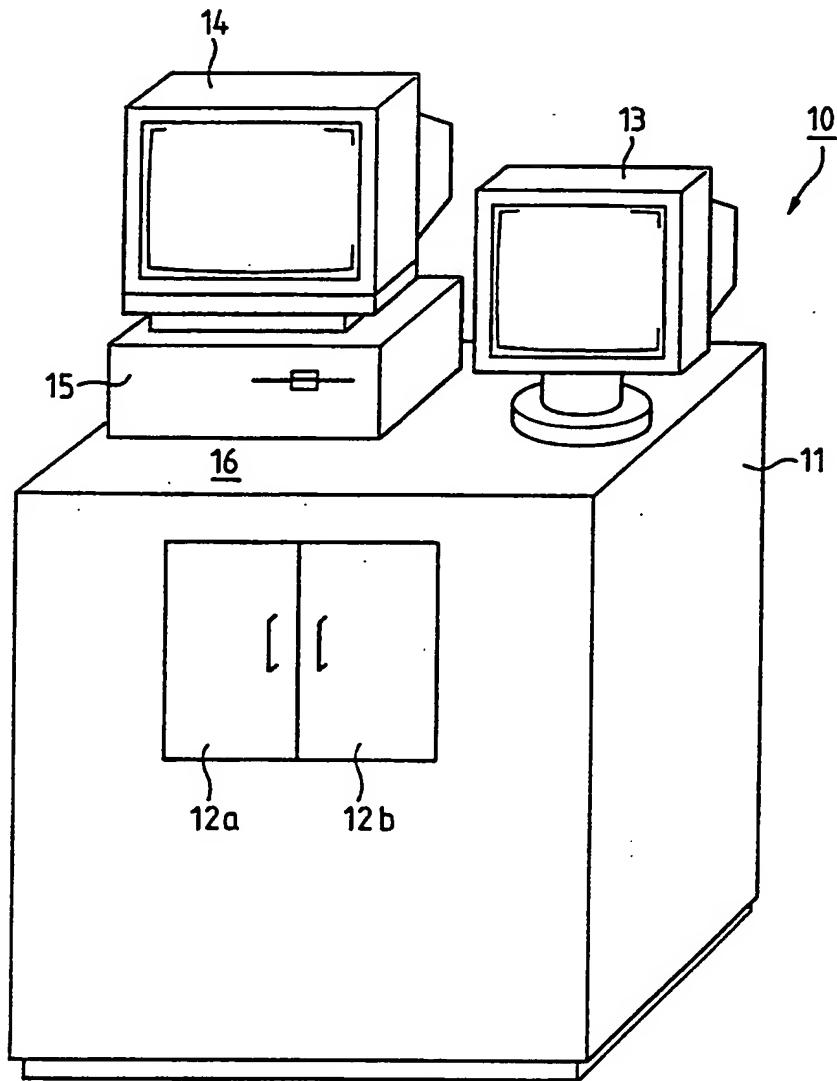


FIG. 2

WO 95/25955

3 / 12

PCT/CH95/00055

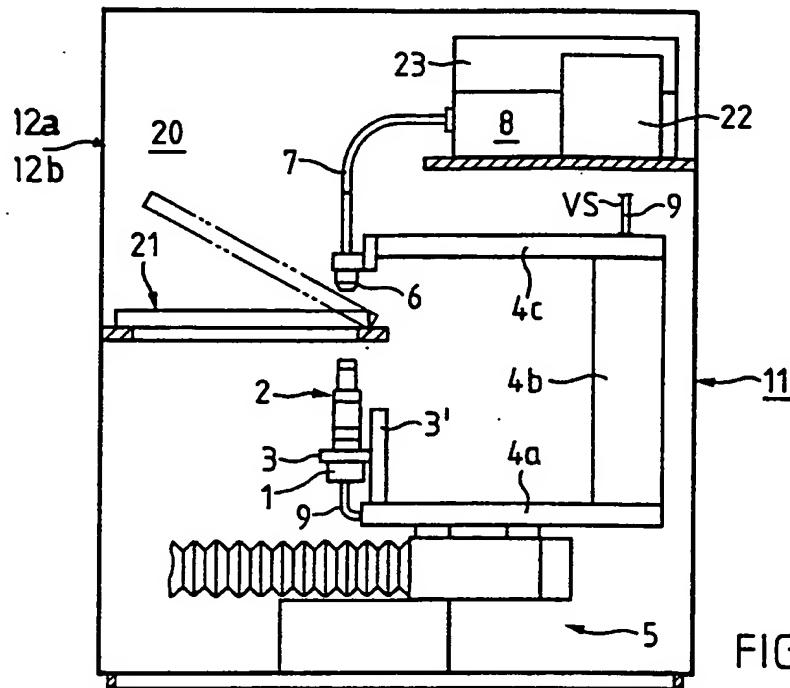


FIG. 3

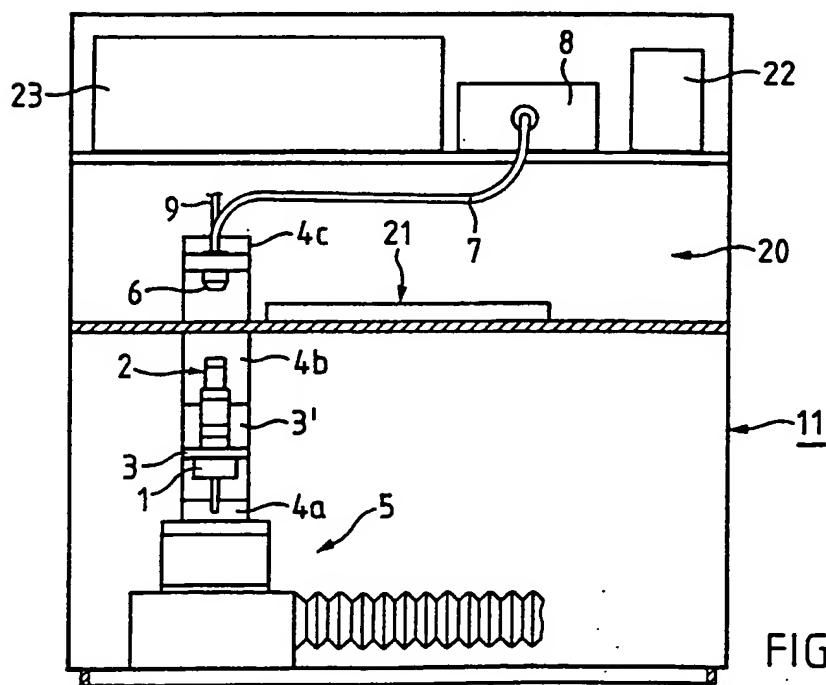


FIG. 4

WO 95/25955

PCT/CH95/00055

4 / 1 2

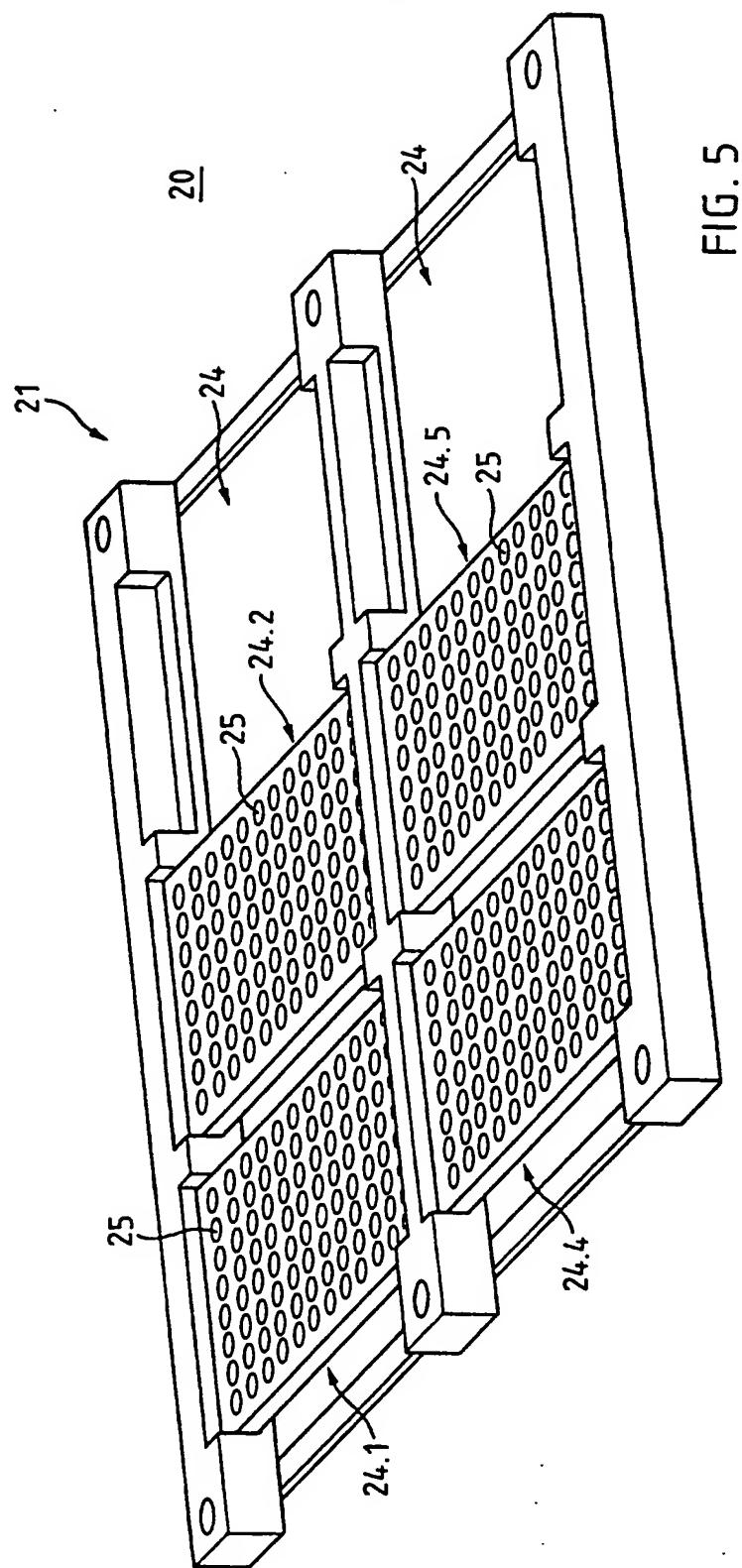


FIG. 5

WO 95/25955

PCT/CH95/00055

5 / 12

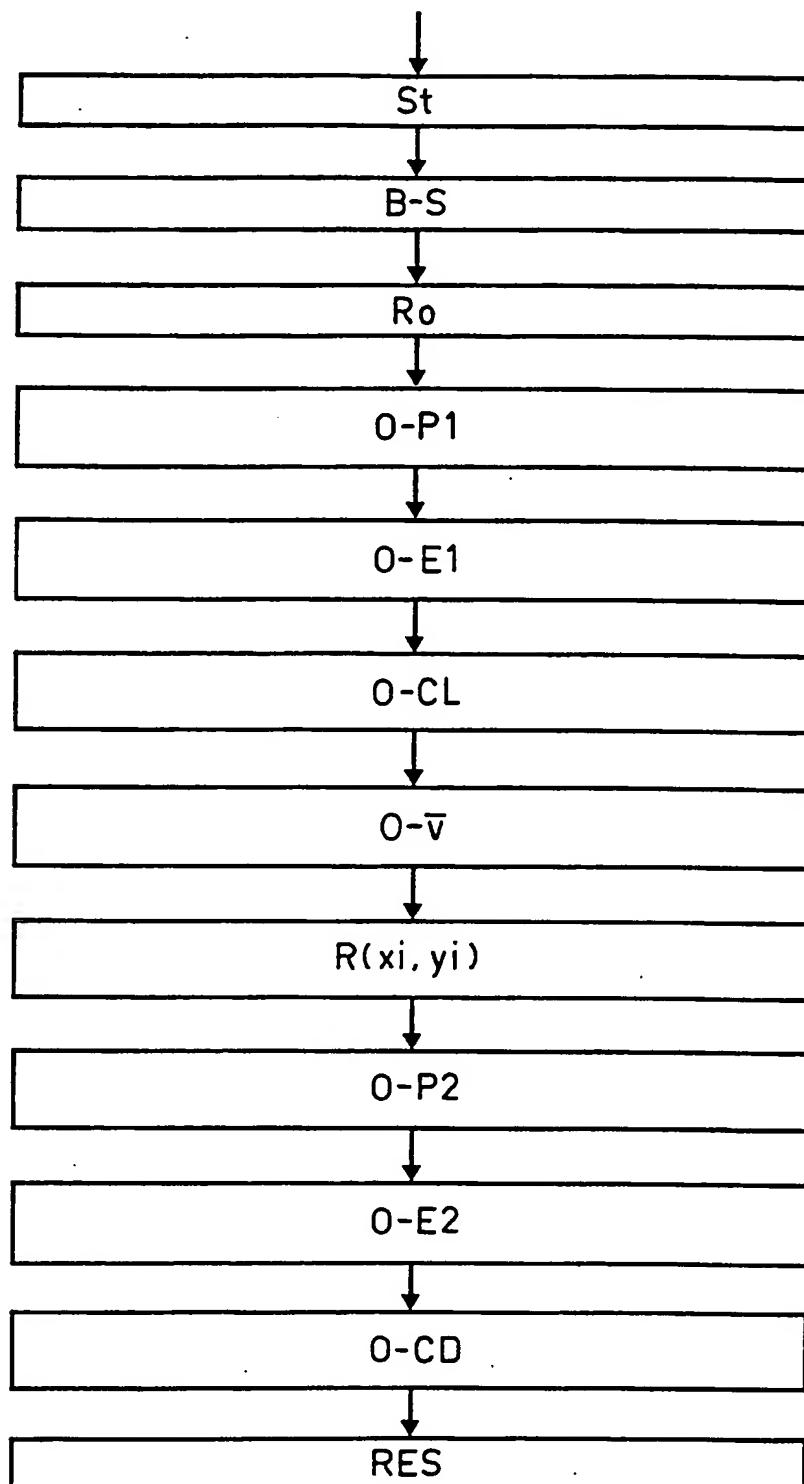


FIG. 6

WO 95/25955

PCT/CH95/00055

6 / 12

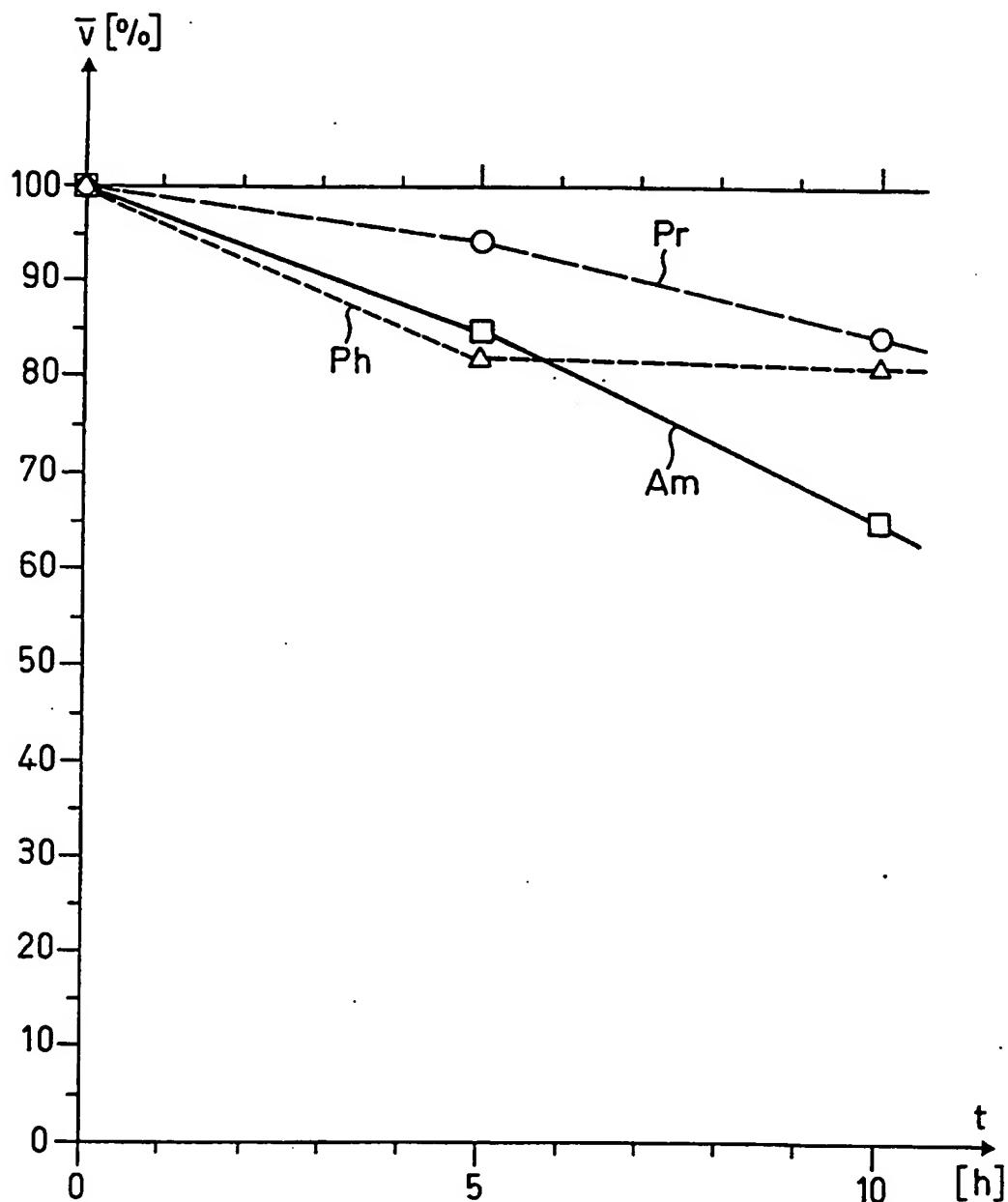
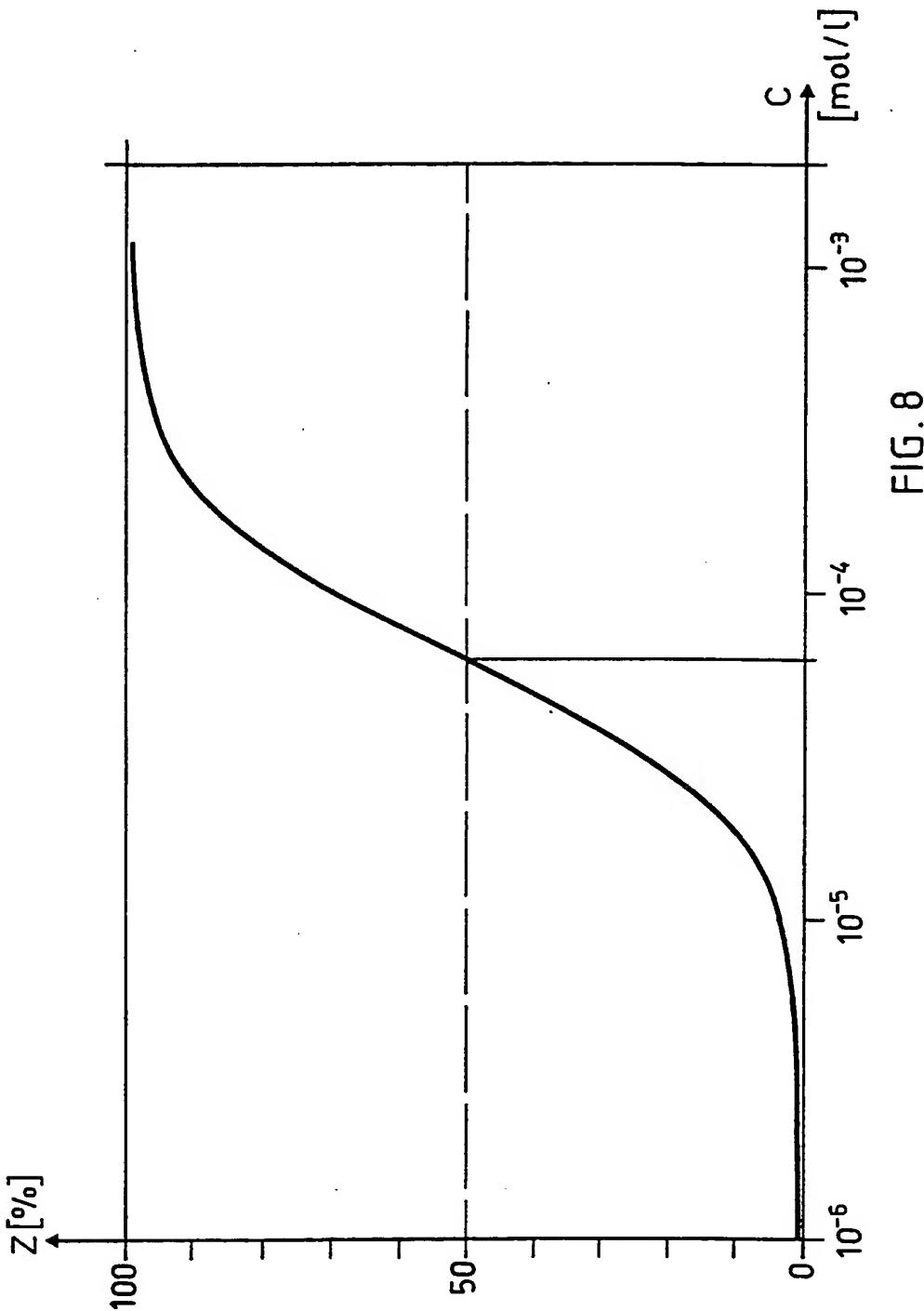


FIG. 7

WO 95/25955

PCT/CH95/00055

7 / 12



WO 95/25955

PCT/CH95/00055

8 / 12

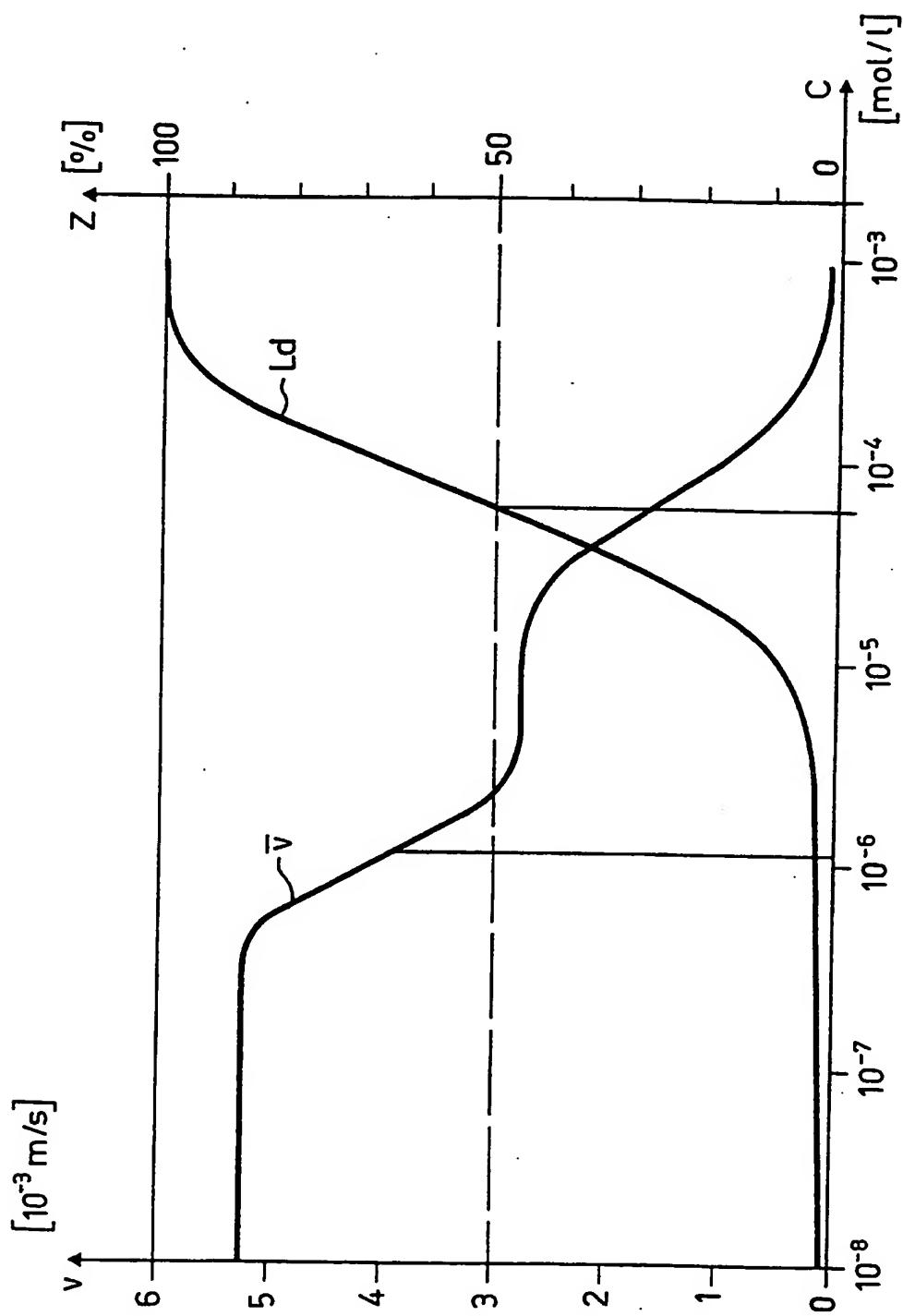
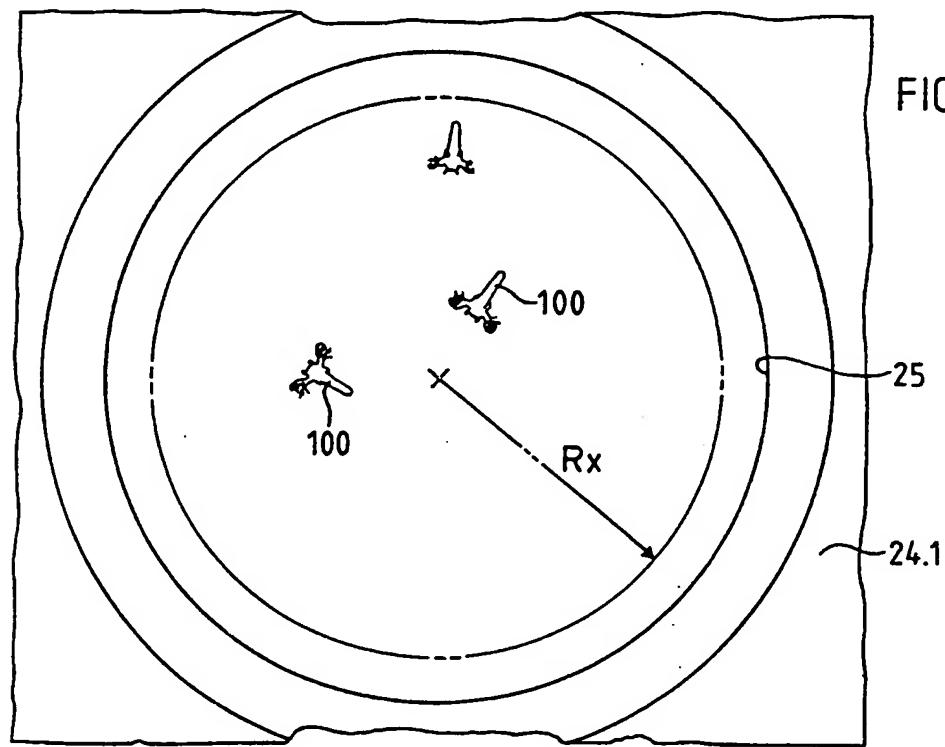
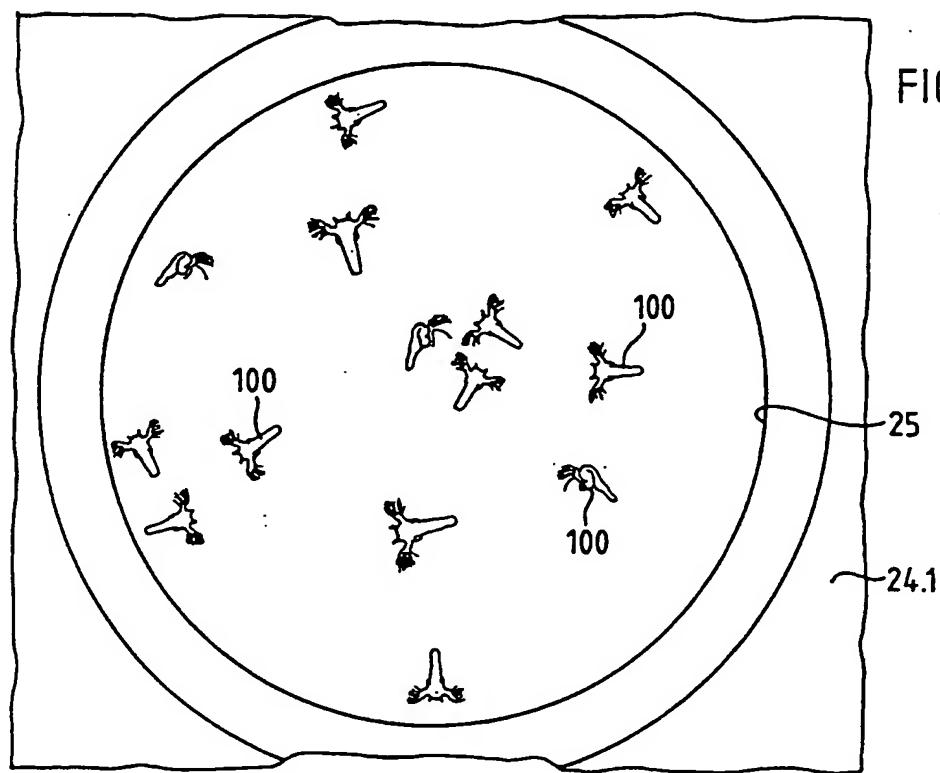


FIG. 9

WO 95/25955

PCT/CH95/00055

9 / 12

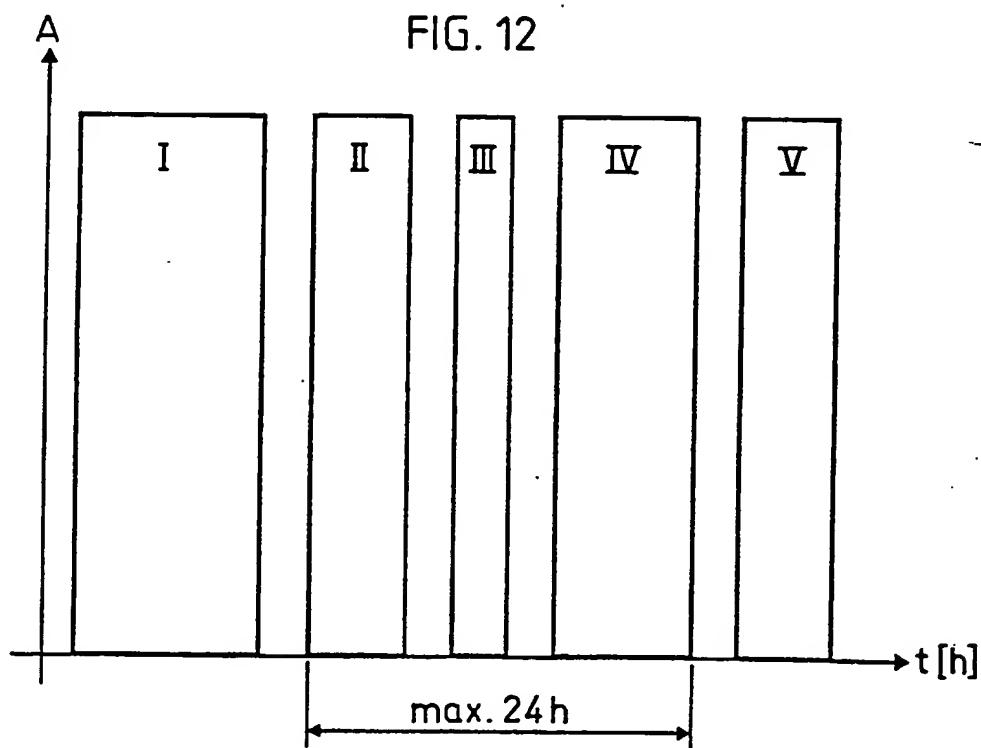


WO 95/25955

PCT/CH95/00055

10 / 12

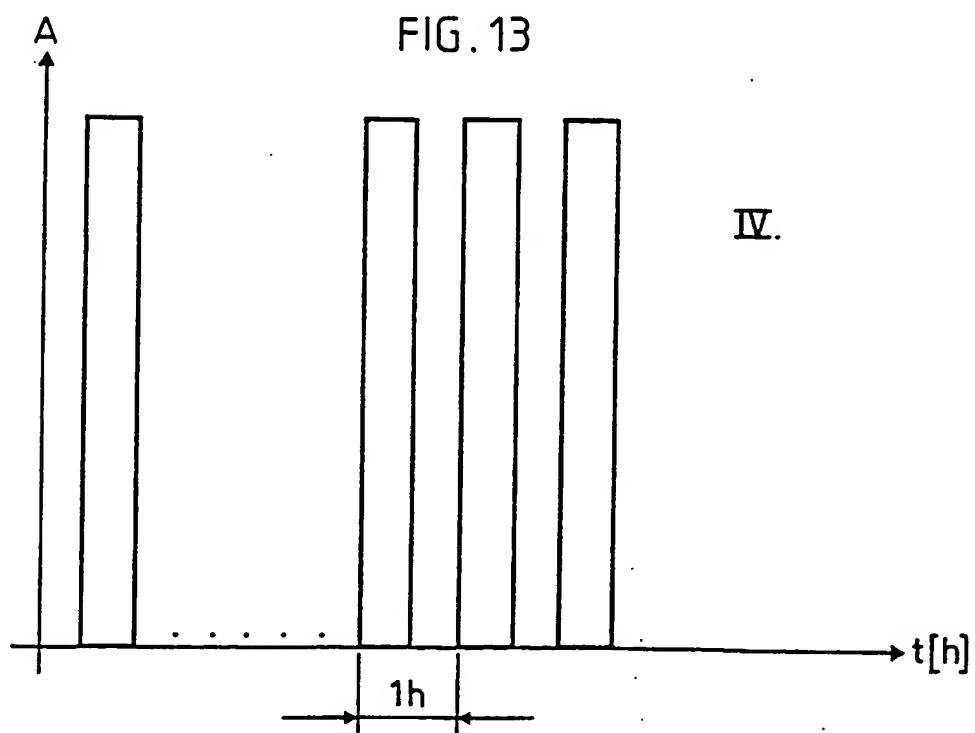
FIG. 12



A

FIG. 13

IV.

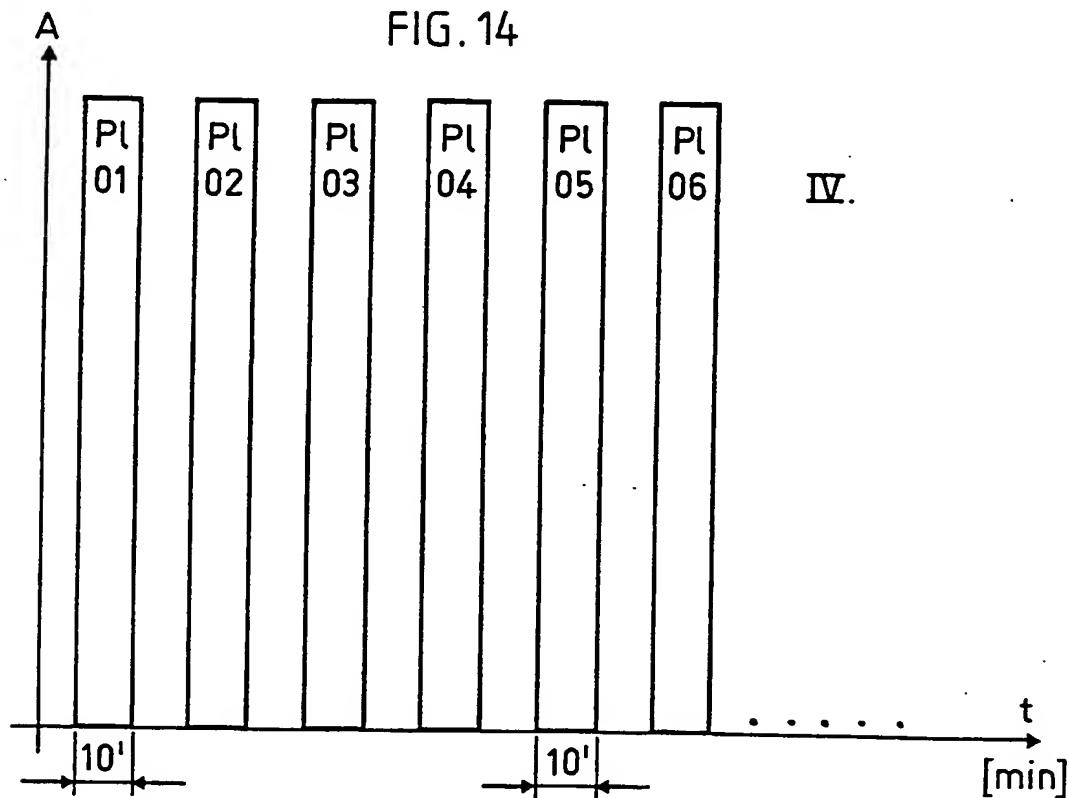


WO 95/25955

PCT/CH95/00055

11 / 12

FIG. 14

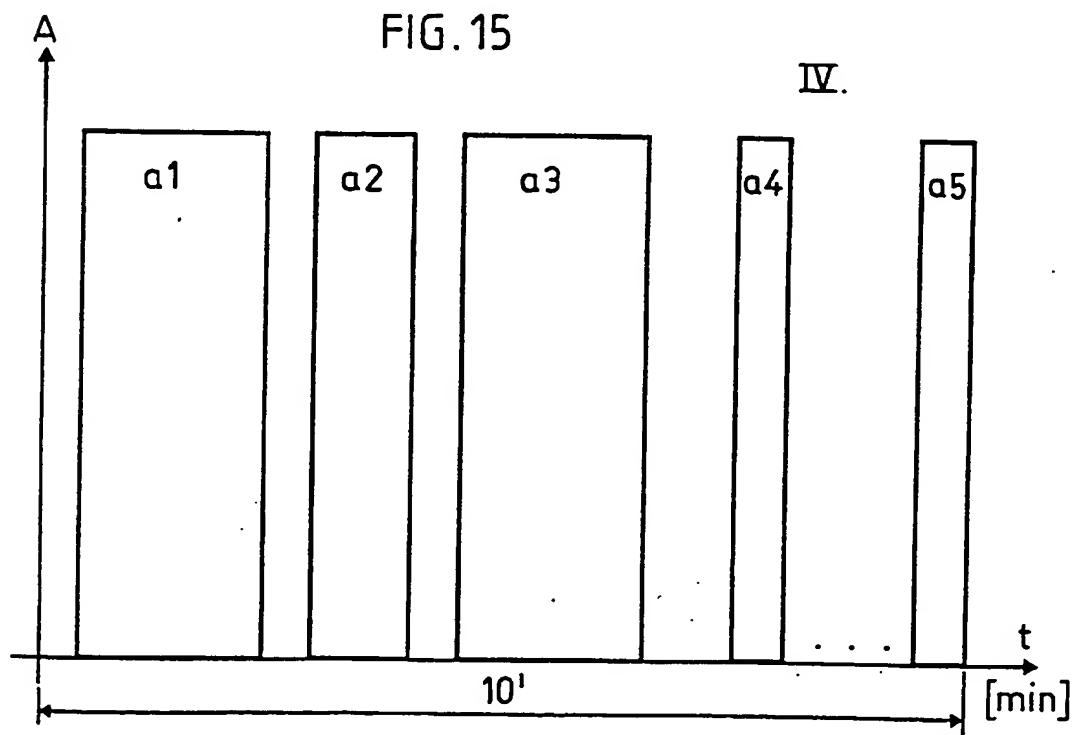


IV.

A

FIG. 15

IV.

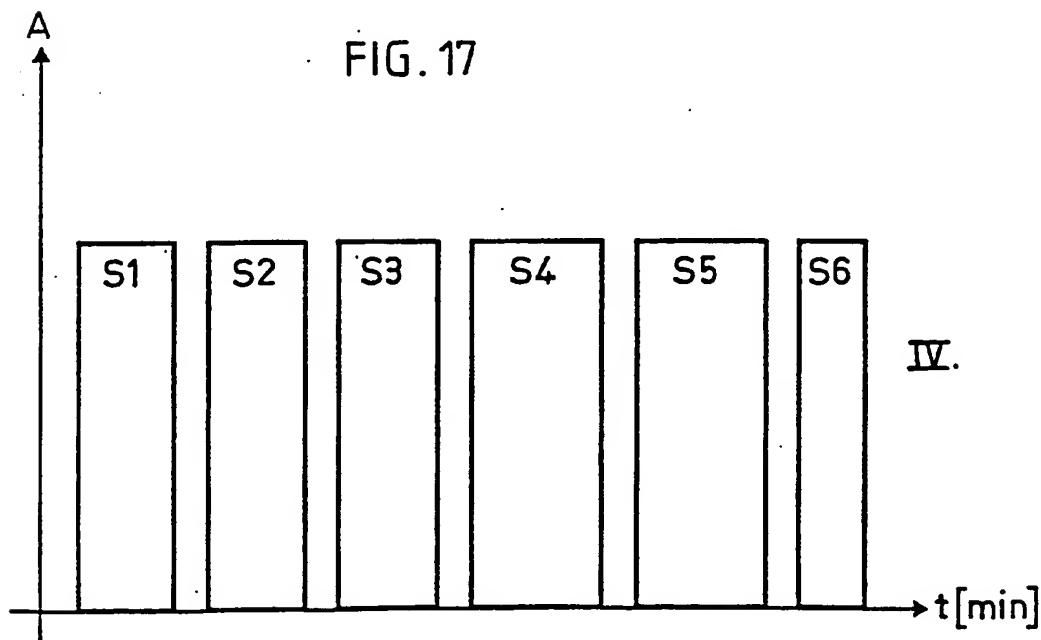
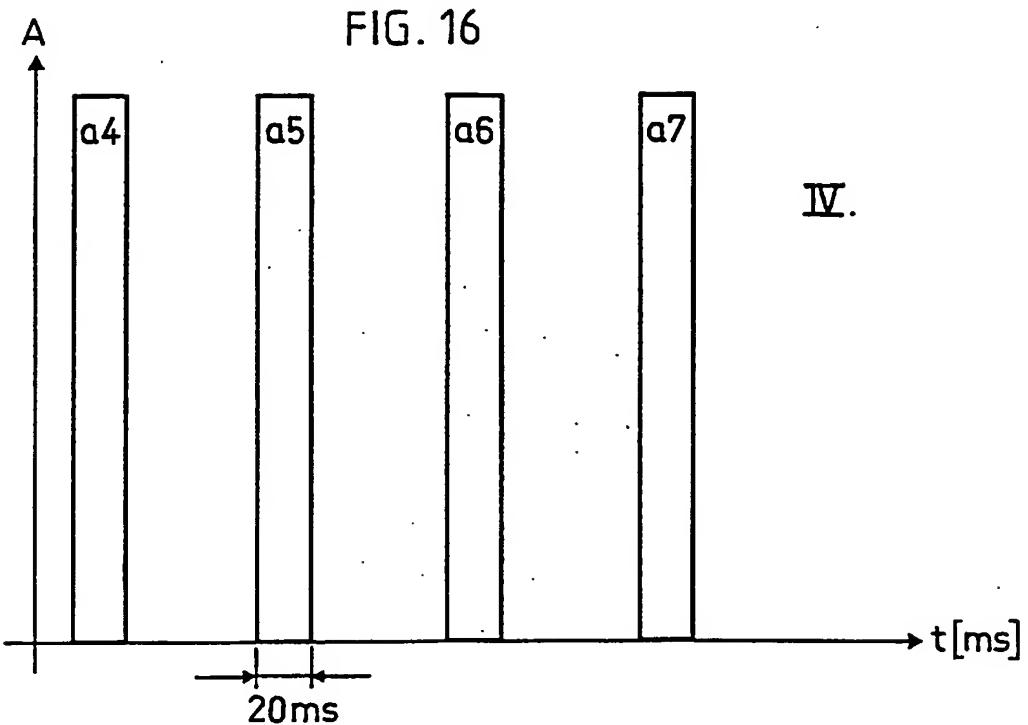


11/12

WO 95/25955

PCT/CH95/00055

12 / 12



12/12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. No

PCT/CH 95/00055

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 G01N33/18 G01N33/15 G01N33/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE,A,33 45 196 (HANS W. SCHMIDT) 4 July 1985	1-5,7, 11-13, 23-25
Y	see the whole document	6,9,15, 16,19
X	DE,A,29 06 194 (ELEKTRON-GESELLSCHAFT WALTER DASSEL & CO) 28 August 1980 see the whole document	1,7
X	DATABASE WPI Section 768, Week 3192 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 92-258109 C31! & SU,A,1 677 630 (MED TECH RES INST) , 15 September 1991 see abstract	1-4,7, 11,12,23
	---	-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *B* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 April 1995

Date of mailing of the international search report

24.05.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bosma, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. No.

PCT/CH 95/00055

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS., vol. 62, NEW YORK US, page 540 SHOJI A. BABA, ET AL. 'Three-dimensional recording and measurement of swimming paths of micro-organisms with two synchronized monochrome cameras' see the whole document ---	15, 16, 19
Y	WO,A,90 12886 (HAYES, KENNETH R.) 1 November 1990 see the whole document ---	6
A	DE,A,39 22 358 (HEINZ WALZ MESS- UND REGELTECHNIK) 10 January 1991 see the whole document ---	1,5,7, 23-25
Y	DE,A,39 22 358 (HEINZ WALZ MESS- UND REGELTECHNIK) 10 January 1991 see the whole document ---	9
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 13 no. 245 (P-881) ,8 June 1989 & JP,A,01 047950 (RES DEV CORP OF JAPAN) 22 February 1989, see abstract -----	1
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 13 no. 245 (P-881) ,8 June 1989 & JP,A,01 047950 (RES DEV CORP OF JAPAN) 22 February 1989, see abstract -----	1,10-12, 15,19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/CH 95/00055

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
DE-A-3345196	04-07-85	NONE			
DE-A-2906194	28-08-80	NONE			
WO-A-9012886	01-11-90	US-A-	5094944	10-03-92	
		AU-A-	5632090	16-11-90	
		CA-A-	2062953	27-10-90	
		JP-T-	4504663	20-08-92	
DE-A-3922358	10-01-91	NONE			

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Aktenzeichen

PCT/CH 95/00055

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTÄNDIS
IPK 6 G01N33/18 G01N33/15 G01N33/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE:

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGEBEHNE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE,A,33 45 196 (HANS W. SCHMIDT) 4.Juli 1985	1-5,7, 11-13, 23-25
Y	siehe das ganze Dokument	6,9,15, 16,19

X	DE,A,29 06 194 (ELEKTRON-GESELLSCHAFT WALTER DASSEL & CO) 28.August 1980 siehe das ganze Dokument	1,7
X	DATABASE WPI Section 768, Week 3192 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 92-258109 C31! & SU,A,1 677 630 (MED TECH RES INST) , 15.September 1991 siehe Zusammenfassung	1-4,7, 11,12,23

	-/-	

 Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- & Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

26.April 1995

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

24.05.95

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bosma, R

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Sales Aktenzeichen

PCT/CH 95/00055

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS., Bd. 62, NEW YORK US, Seite 540 SHOJI A. BABA, ET AL. 'Three-dimensional recording and measurement of swimming paths of micro-organisms with two synchronized monochrome cameras' siehe das ganze Dokument ----	15, 16, 19
Y	WO,A,90 12886 (HAYES, KENNETH R.) 1.November 1990	6
A	siehe das ganze Dokument	1,5,7, 23-25
Y	DE,A,39 22 358 (HEINZ WALZ MESS- UND REGELTECHNIK) 10.Januar 1991	9
A	siehe das ganze Dokument	1
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 13 no. 245 (P-881) ,8.Juni 1989 & JP,A,01 047950 (RES DEV CORP OF JAPAN) 22.Februar 1989, siehe Zusammenfassung -----	1,10-12, 15,19

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/CH 95/00055

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE-A-3345196	04-07-85	KEINE		
DE-A-2906194	28-08-80	KEINE		
WO-A-9012886	01-11-90	US-A-	5094944	10-03-92
		AU-A-	5632090	16-11-90
		CA-A-	2062953	27-10-90
		JP-T-	4504663	20-08-92
DE-A-3922358	10-01-91	KEINE		